



UNIVERSIDAD CÉSAR VALLEJO

FACULTAD DE CIENCIAS MÉDICAS

ESCUELA ACADÉMICA PROFESIONAL DE MEDICINA

**EFFECTO ANTIBACTERIANO DEL EXTRACTO ETANÓLICO *Hibiscus rosa-Sinensis linn* “rosa de china” SOBRE *Escherichia coli* ATCC25922
COMPARADO CON CIPROFLOXACINO**

**TESIS PARA OBTENER EL TÍTULO PROFESIONAL DE
MÉDICO CIRUJANO**

AUTORA:

AVALOS FLORES CARLA CATERINA

ASESORES:

DRA. LLAQUE SÁNCHEZ MARÍA ROCÍO DEL PILAR

MG. BLOG. POLO GAMBOA JAIME ABELARDO

LÍNEA DE INVESTIGACIÓN

ENFERMEDADES INFECCIOSAS Y TRANSMISIBLES

Trujillo – Perú

2018

DEDICATORIA

Al gran amor de mi vida quien es madre y padre a la vez, la señora Carmelina Flores Rivera, quien ha trabajado duro para darme educación, quien ha depositado su entera confianza sin dudar ni un solo momento en mi inteligencia y capacidad. Es por ella que soy lo que soy ahora.

A mi segunda madre la señorita Hilaria Flores Rivera quien me ha cuidado como a una hija, quien siempre me ha brindado su apoyo incondicional, quien me motivó cada día a ser mejor

A mi abuelita Efrocinia Rivera Cajaleon, quien desde que partió se ha convertido en mi ángel de la guarda, Dios la tenga en su gloria.

ÁVALOS FLORES, CARLA CATERINA

AGRADECIMIENTO

A Dios por la gran bendición que me ha dado, por guiar mis pasos, cuidándome y dándome mucha fortaleza para continuar.

A todos los docentes de la Universidad César Vallejo quienes con sabiduría compartieron sus conocimientos.

A mis asesores: Dra. María Rocío Del Pilar Lláque Sánchez y Mg. Blog. Jaime Polo Gamboa por brindarme su desinteresado apoyo siempre que lo requerí y por dedicarme parte de su preciado tiempo en la realización de esta tesis.

A la Universidad César Vallejo por haberme brindado la oportunidad de cumplir uno de mis grandes sueños, por ser la sede de todo el conocimiento que he adquirido en estos años.

AVALOS FLORES, CARLA CATERINA

DECLARATORIA DE AUTENCIDAD

Yo, CARLA CATERINA AVALOS FLORES con DNI 45707253, estudiante de la Escuela Profesional de Medicina Humana de la Facultad de Ciencias Médicas, a efecto de cumplir con las disposiciones vigentes consideradas en el Reglamento de Grados y Títulos de la Universidad César Vallejo, declaro bajo juramento que todos los datos e información que acompañan a la Tesis titulada: EFECTO ANTIBACTERIANO DEL EXTRACTO ETANÓLICO *Hibiscus rosa-Sinensis linn* “rosa de china” SOBRE *Escherichia coli* ATCC25922 COMPARADO CON CIPROFLOXACINO, son:

1. De mi autoría.
2. He respetado las normas internacionales de citas y referencias para las fuentes consultadas, por tanto, la tesis no ha sido plagiada ni total ni parcialmente.
3. La tesis no ha sido autoplagiada, es decir, no ha sido publicada ni presentada anteriormente para obtener algún grado académico previo o título profesional.
4. Los datos presentados en los resultados son reales, no han sido falseados, ni duplicados ni copiados y por tanto los resultados que se presentan en la tesis se constituirán en aportes a la realidad investigada.

En tal sentido asumo la responsabilidad que corresponda ante cualquier falsedad, ocultamiento u omisión tanto de los documentos como la información aportada por al cual me someto a lo dispuesto en las normas académicas vigentes de la Universidad César Vallejo.

ÁVALOS FLORES CARLA CATERINA

Trujillo, de diciembre de 2018

PRESENTACIÓN

Señores miembros del Jurado:

En cumplimiento del Reglamento de Grado y Títulos de la Universidad César Vallejo presento ante ustedes la Tesis titulada: EFECTO ANTIBACTERIANO DEL EXTRACTO ETANÓLICO *Hibiscus rosa-Sinensis* linn “rosa de china” SOBRE *Escherichia coli* ATCC25922 COMPARADO CON CIPROFLOXACINO, la misma que someto a vuestra consideración y espero que cumpla con los requisitos de aprobación para obtener el título Profesional de Médico Cirujano.

ÁVALOS FLORES CARLA CATERINA

ÍNDICE

PÁGINAS PRELIMINARES

PÁGINA DEL JURADO.....	i
DEDICATORIA.....	ii
AGRADECIMIENTO.....	iii
DECLARATORIA DE AUTENTICIDAD.....	iv
PRESENTACIÓN.....	v
ÍNDICE.....	vi
RESUMEN.....	vii
ABSTRACT.....	viii
I. INTRODUCCION.....	1
1.1 REALIDAD PROBLEMÁTICA.....	1
1.2 TRABAJOS PREVIOS.....	2
1.3 TEORÍAS RELACIONADAS AL TEMA.....	5
1.4 FORMULACIÓN DEL PROBLEMA.....	9
1.5 JUSTIFICACIÓN DEL ESTUDIO.....	9
1.6 HIPÓTESIS.....	10
1.7 OBJETIVOS.....	10
1.7.1 OBJETIVO GENERAL.....	10
1.7.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	10
II. MÉTODO.....	11
2.1 DISEÑO DE INVESTIGACIÓN Y TIPO DE INVESTIGACIÓN:.....	11
2.2 VARIABLES Y OPERALIZACIÓN.....	11
2.3 POBLACIÓN Y MUESTRA.....	13
2.4 TÉCNICAS E INSTRUMENTOS DE RECOLECCIÓN DE DATOS, VALIDEZ Y CONFIABILIDAD.....	14
2.5 MÉTODOS DE ANÁLISIS DE DATOS.....	15
2.6 ASPECTOS ÉTICOS:.....	15
III. RESULTADOS.....	16
IV. DISCUSION.....	20
V. CONCLUSION.....	22
VI. RECOMENDACIONES.....	23
VII. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	24
VIII. ANEXOS.....	30

RESUMEN

Debido a la resistencia antibacteriana que ha ido incrementando en estos últimos años se ha promovido la búsqueda de plantas con propiedades antibacterianas, en este contexto se realizó un estudio experimental, cuyo objetivo fue determinar el efecto antibacteriano in vitro del extracto de la flor de *Hibiscus rosa-Sinensis linn* “rosa de china” comparado con Ciprofloxacino a la concentración de (5 µg) sobre cepas de *Escherichia coli* ATCC25922. Se trabajó con las siguientes diluciones (100%, 75%, 50% y 25%) y un control neutro de DMSO; realizándose 10 repeticiones por cada grupo de estudio. En la ejecución del experimento se obtuvo que el extracto etanólico de la flor de *Hibiscus rosa-Sinensis linn* “rosa de china” muestra cierto grado de inhibición a partir del 75% (8.60 mm de halo de inhibición), a 100% se evidencia el mayor halo de inhibición (13.10 mm DS: 1.197 ± 0.379 . IC 95%: 12.24 a 13.96 con intervalos de 11 a 15 mm), valores considerados como no eficaces según el patrón del CLSI (<21mm). El halo de inhibición del ciprofloxacino fue 28.10 mm (DS: 1.370 ± 0.433 . IC 95%: 27.12 a 29.08 con intervalos de 25 a 30 mm) mostrando un halo de inhibición casi dos veces mayor que el halo de inhibición a la dilución al 100% de la flor. Concluyéndose, que el extracto de *Hibiscus rosa-Sinensis linn* presenta efecto antibacteriano, siendo mayor en altas concentraciones, pero su efecto antibacteriano es menor que el ciprofloxacino.

Palabras claves: Extracto etanólico, flor de *Hibiscus rosa-Sinensis linn*, *Escherichia coli*, efecto antibacteriano

ABSTRACT

Due to the antibacterial resistance that has been increasing in recent years, the search for plants with antibacterial properties has been promoted, in this context an experimental study was carried out, whose objective was to determine the in vitro antibacterial effect of the extract of the pink Hibiscus flower -Sinensis linn "rose of china" compared with Ciprofloxacin at the concentration of (5 µg) on strains of Escherichia coli ATCC25922. We worked with the following dilutions (100%, 75%, 50% and 25%) and a neutral control of DMSO; performing 10 repetitions for each study group. In the execution of the experiment it was obtained that the ethanolic extract of the flower of Hibiscus rosa-Sinensis linn "rose of china" shows a certain degree of inhibition from 75% (8.60 mm of halo of inhibition), to 100% it is evidenced greater inhibition halo (13.10 mm DS: 1197 ± 0.379 , 95% CI: 12.24 to 13.96 with intervals of 11 to 15 mm), values considered as not effective according to the CLSI pattern (<21 mm). The halo of inhibition of ciprofloxacin was 28.10 mm (DS: 1370 ± 0.433 , 95% CI: 27.12 to 29.08 with intervals of 25 to 30 mm) showing an inhibition halo almost twice greater than the inhibition halo at 100% dilution of the flower. Concluding, that the extract of Hibiscus rosa-Sinensis linn has antibacterial effect, being higher in high concentrations, but its antibacterial effect is lower than ciprofloxacin.

Keywords: *Ethanolic extract, Hibiscus rosa-Sinensis linn flower, Escherichia coli, antibacterial effect*

I. INTRODUCCIÓN

1.1. REALIDAD PROBLEMÁTICA

La Organización Mundial de la Salud (OMS) el 2014 refiere que las bacterias han sufrido diversos cambios provocando de esta manera resistencia a los antibióticos, el cual se ha propagado al mundo convirtiéndose así en un peligro inminente para la salud pública. Así mismo se enfocan en 7 bacterias causantes de graves infecciones comunes como la neumonía, la diarrea, la septicemia, la infección del tracto urinario (ITU). Entre los hallazgos sobresale la resistencia a las fluoroquinolonas, las cuales se utilizan para el tratamiento de la ITU por *Escherichia coli* (*E. coli*). Cabe mencionar que en los años 80 la resistencia frente a ellos era inexistente.¹

En EE.UU. en los últimos años se han reportado cerca de 7 000 000 de consultas médicas y 1 000 000 de hospitalizaciones cada año por ITU, de los cuales se han presentado 53 067 casos de cada 100 000 mujeres y 13 689 de cada 100 000 varones generando un costo de 1.6 mil millones de dólares por año.² En el año 2006 las bacterias que con mayor frecuencia se aislaron fueron *E. coli* (85%) y el *Proteus* (5.29%). El *E. coli* presentó mayores tasas de resistencia frente ciprofloxacino, ampicilina y trimetoprim sulfametoxazol.³

Las consultas más frecuentes en el Perú son ITU y del tracto gastrointestinal causadas por el *E. coli* representado en un 85 – 95%. Estudios actuales que se han realizado en nuestro país, denotan un aumento de la resistencia de *E. coli* frente a los siguientes fármacos cotrimoxazol 78.6%, ampicilina es de 62.6%, tetraciclina 43 %, y cloranfenicol 15.8%, esto conlleva a la necesidad de buscar nuevos tratamientos alternativos.⁴

1.2. TRABAJOS PREVIOS

Abhishek P, et al. (India, 2016) evaluaron la actividad antimicrobiana de 6 plantas etno-medicinales dentro de ellas estuvo *Hibiscus rosa sinensis linn* contra patógenos cariogénicos. El estudio fue de tipo experimental. Como población tuvo 5 bacterias gramnegativas. Los extractos se prepararon usando polvo de plantas secas disuelto en tres disolventes diferentes (agua destilada, metanol y etanol). Las soluciones resultantes se liofilizaron y el polvo obtenido se disolvió en dimetilsulfóxido (DMSO) que significa al 10%. Se utilizó un ensayo de difusión de pozos de agar. Se añadió kanamicina (100 mug/ml) utilizado como control positivo y DMSO (10%) como control negativo en ensayo de difusión de pozos de agar. Donde concluyeron que el extracto de agua destilada de *Hibiscus rosa-Sinensis linn* tuvo mayor actividad antibacteriana contra la *C. albicans* mostrando un halo de inhibición de 20 mm.⁵

Umiya S, et al. (India, 2015) evaluaron la actividad antibacteriana del extracto de 2 flores entre ellas la flor de *Hibiscus rosa-Sinensis linn* contra algunas bacterias aisladas. El estudio fue de tipo experimental. La preparación fue en crudo de las flores de *Hibiscus rosa-Sinensis Linn* contra 5 bacterias una de ellas fue *Escherichia coli*, el antibiótico estándar fue la ampicilina en solución. Lo realizaron mediante el método de difusión en gel de agar con 50 mg/ pocillo para obtener mejores resultados. Encontraron una zona de inhibición contra *Escherichia coli* de 11mm. Concluyeron que los extractos de las flores tienen propiedades antimicrobianas.⁶

Tiwari U, et al. (India, 2015) evaluaron la actividad antibacteriana según la zona de inhibición por medio del método de difusión en disco contra 2 bacterias dentro de los cuales estuvo el *Escherichia coli* en diferentes concentraciones de los extractos de hoja y flor metanólicos del *Hibiscus rosa Sinensis linn*. El estudio fue de tipo experimental. El fármaco de control positivo fue de gentamicina (1mg). Observaron que ambos extractos mostraron propiedad antibacteriana creciente con aumento en la

concentración del extracto. La zona máxima de inhibición observada tanto para extractos metanólicos de hojas es $23 \pm 1,01$ mm y de flores es $13,75 \pm 0,99$ mm a concentración de 500 mg para *Escherichia coli*. Concluyeron que los extractos metanólicos tanto de hojas como de las flores de *Hibiscus rosa Sinensis linn* tienen compuestos farmacológicamente activos con potencial antibacteriano.⁷

Agarwal S, et al. (India, 2014) evaluaron la actividad antibacteriana de la solución acuosa y disolvente del extracto de las flores rojas de *Hibiscus rosa-Sinensis linn* frente a patógenos humanos por medio del método de difusión en disco. El estudio fue de tipo experimental. Las bacterias que emplearon fueron 2 entre las cuales se presenta la *Escherichia coli*. El disolvente fue el Hexano. El extracto mostró la zona más alta de Inhibición *Escherichia coli* de $18,00 \pm 1,53$ mm. Concluyeron que estos extractos inhiben el crecimiento de patógenos humanos.⁸

Ali Z, et al. (Pakistán, 2014) evaluaron las actividades antioxidantes y antibacterianas del extracto de la flor de *Hibiscus rosa-Sinensis linn*, el estudio fue de tipo experimental. Las actividades antibacterianas del extracto crudo fueron contra 3 bacterias entre ellas la *Escherichia coli*. Observaron que el metanol mostro un halo de inhibición de $12,75 \pm 1,17$ mm y los extractos de etanol mostraron una zona de inhibición de $16,75 \pm 2,10$ mm. Concluyeron que las flores de *Hibiscus rosa-Sinensis linn* tiene propiedades medicinales que pueden desempeñar un papel terapéutico frente estos patógenos.⁹

Jayakumar V, et al. (India, 2014) evaluaron la actividad antibacteriana de pétalos de 2 flores, *Hibiscus rosa-Sinensis Linn* fue uno de ellos, contra el patógeno dental por método de difusión de pozos. El estudio fue de tipo experimental. El patógeno de caries dental fue *Streptococcus mutans* el cual fue aislado e identificado en base a características culturales, morfológicas y bioquímicas. Se encontró que la alta concentración de 300 μ l de extracto de metanol de *Hibiscus rosa-Sinensis linn* mostraron un halo de inhibición de

23.08 \pm 1.645 mm. Concluyeron que la ingesta de pétalos de *H. rosa-Sinensis linn* reduce la caries dental.¹⁰

Wei Y, et al. (Malasia, 2013) evaluaron la actividad antibacteriana y antioxidante del extracto de 2 flores la cual una de ellas es la flor de *Hibiscus rosa-Sinensis linn*, el estudio fue de tipo experimental en el cual usaron el método de difusión en agar. La población fueron distintas bacterias Gram-positivas y Gram-negativos. La zona de inhibición fue de 4.14 mm de *Hibiscus rosa-Sinensis linn*. Concluyeron que las flores de *Hibiscus rosa-Sinensis linn* no solo son ricas por su actividad antioxidante, sino que también poseen propiedades antibacterianas frente bacterias Gram-positivas y Gram-negativos.¹¹

Ruban P, et al (India, 2012) evaluaron la actividad antibacteriana del extracto de la flor de *Hibiscus rosa-Sinensis linn* contra patógenos humanos. El estudio fue de tipo experimental. Tuvo como población 8 bacterias entre ellas la *Escherichia coli*. El resultado de la extracción en frío ilustra una zona de máximo de inhibición frente *Escherichia coli* de 14,50 \pm 1,71 mm, seguido de extracción caliente contra, *Escherichia coli* 11,66 \pm 3,14 mm. La extracción en metanol mostró una zona más alta de la inhibición registrado contra *Escherichia coli* como 18,00 \pm 1,63mm. La proteína en bruto de la flor mostró una zona inhibitoria máxima observada contra *Escherichia coli* de 14,30 \pm 2,86 mm. Concluyeron que los extractos de *Hibiscus rosa-Sinensis linn* tienen actividad antibacteriana.¹²

Uddin B, et al. (Bangladés, 2010) evaluaron la actividad antibacteriana de los extractos de flores y hojas de *Hibiscus rosa-Sinensis linn* contra algunas bacterias por el método de simple difusión en pozo-agar y método de enumeración bacteriológica. El estudio fue de tipo experimental de selección preliminar. Como población tuvo 1 bacteria Gram-positivas y 6 bacterias Gram-negativas entre ellas la *Escherichia coli*. Se observó una zona máxima de inhibición contra *Escherichia coli* de 13 mm. Concluyeron que los

extractos de flores y hojas de la planta de *Hibiscus rosa-Sinensis linn* tienen efectos antibacterianos.¹³

Sangeetha A, et al. (Malasia, 2009) evaluaron la actividad antibacteriana del extracto de *Hibiscus rosa-Sinensis linn* mediante el extracto de éter de petróleo a partir de flores de la planta; el estudio fue de tipo experimental y tuvo como población 4 bacterias; usaron una técnica de extracción en frío. El extracto de éter de petróleo de las flores a concentraciones de 4 mg mostró zonas fuertes de inhibición de $18,6 \pm 2,85$ mm en *Escherichia coli*. Concluyeron que el extracto tiene propiedad antibacteriana contra *Escherichia coli*.¹⁴

1.3. TEORÍAS RELACIONADAS AL TEMA

OMS refiere que las patologías infecciosas son causadas frecuentemente por bacterias, parásitos, virus y hongos los cuales se transmiten de forma directa o indirecta¹⁵. A fines del siglo XIX el Alemán Theodore von Escherich en el nosocomio infantil Hauner, conoció a Wilhelm Frobenius un discípulo de Koch quien lo motivó hacia la bacteriología. Empezó con mucho tesón el estudio de la flora intestinal humana, en 1885 descubrió que empezaban a aparecer bacterias en las deposiciones del recién nacido inmediatamente después de la lactancia, aislando 2 bacterias de las heces a la primera llamó *Bacterium coli commune* y a la segunda *Bacterium coli aerogenes*. Posteriormente en el año de 1954 la taxonomía le adjudicó su nombre definitivo de la primera bacteria como *Escherichia coli*.¹⁶

E. coli es un bacilo Gram negativo móvil, pertenece a la familia de las enterobacterias, forma colonias circulares, convexas y lisas con bordes distintivos. Se encuentran presentes en el tracto gastrointestinal del hombre y diversos animales, es el aerobio facultativo más abundante alcanzando concentraciones bacterianas en heces de 10^9 bacilos por gramo. Suele producir pruebas con positividad para lisina descarboxilasa, indol, fermentación de manitol y gas a partir de la glucosa^{17 18}

E. coli es el agente causal de múltiples enfermedades tales como gastroenteritis e infecciones extraintestinales como la meningitis, sepsis e ITU. La virulencia de la bacteria se debe a la capacidad de producir adhesinas como pili P así mismo tenemos adhesinas proteicas no fímbricas que son proteínas superficiales AAF-I, AA-FII y las fimbrias Dr, los cuales se adhieren a las células que recubren al aparato urinario y hemolisina H1yA que lisa los glóbulos rojos y otras células conllevando a la liberación de citosinas y a la respuesta inflamatoria.¹⁹

Las causas más frecuentes de infección urinaria en las mujeres jóvenes es por *E. coli* debido a la migración de la bacteria desde la región periuretral, las manifestaciones clínicas son disuria, polaquiuria, hematuria y piuria.²⁰

El ciprofloxacino es una quinolona fluorada de segunda generación, posee actividad antimicrobiana contra cepas de *E. coli*, Shigella, Salmonella, Neisseria, Campylobacter y Enterobacter. Su mecanismo de acción frente a los bacilos Gram negativos radica en la inhibición de la topoisomerasa II o DNA girasa. *E. coli* está constituida por la subunidad A codificada por el gen *grA* y 2 subunidades B codificadas por el gen *gyrB*. Las subunidades A se encargan de separar las cadenas y constituyen el sitio de acción del fármaco, el cual inhibe el enrollamiento del DNA. Las mutaciones que han sufrido los genes que codifican los péptidos de la subunidad A les confieren la resistencia frente a estos fármacos. La 4 subunidad codificada por los genes *parE* y *parC* en *E. coli* están formadas por la topoisomerasa IV el cual se encarga de separar las moléculas hijas del DNA interligadas que resultan del producto de la replicación del DNA.²¹

Se absorben bien por el tracto gastrointestinal superior y se metabolizan en el hepatocito CYP 450, concentración máxima 1 a 3 horas, tiempo de vida media 3 a 4 horas y en pacientes con insuficiencia renal 10 horas, tiene distribución amplia en el organismo y alcanzan concentraciones intracelulares en macrófagos, neutrófilos (polimorfos nucleares). Difunden

líquido prostático, mucosa nasal, epitelio bronquial, tejido óseo, humor acuoso, leche y LCR 5%. Excreción renal, respecto a sus reacciones adversas ocasionan náuseas, diarrea, pérdida de apetito, hipersensibilidad de la piel a la radiación UV, dolor en las articulaciones, dolor de cabeza, mareos, artralgia, tendinopatías, rotura del tendón de Aquiles, convulsiones, dolor muscular e hipersensibilidad.²²

Hay más de 250 especies de Hibiscus de las cuales de uso medicinal más utilizados son *Hibiscus rosa-Sinensis linn* llamado Hibiscus común o *rosa de China*, Hibiscus sabdariffa y el Hibiscus syriacus.²³ La flor de *Hibiscus rosa-Sinensis linn* es nativo de China pertenece a la familia de las malváceas.²⁴

Son arbustos ornamentales o árboles de pequeño porte originarios de climas tropicales miden hasta 5 m de altura. Las hojas son ovaladas-lanceoladas de color verde oscuro de aspecto brillante más o menos acuminadas, irregulares y gruesamente dentadas hacia la parte superior, las flores son grandes y solitarias de color rojo aunque existen de distintos colores generalmente, tienen 5 pétalos generalmente florecen de Mayo a Setiembre, los estambres se disponen en forma columnar, la corola es tubular inferior de color rojo mide 7,5 cm de diámetro. Los tallos son erectos y ramificados.^{25,26}

Los capullos de las flores tienen propiedades astringentes y refrescantes mientras que las flores son refrigerantes, emoliente, demulcente, afrodisíaco, en Khagrabari lo utilizan para la disentería. El Jugo de la flor con jugo de inflorescencia de banano cura la disentería aguda, Las flores ya sea fritas en ghee o con la raíz se dan en la menorragia, el polvo de la flor tiene propiedades antiinflamatorias y el extracto acuoso de la planta tiene actividad antitumoral contra el sarcoma 180. La tribu Marma en Chittagong Hill Tracts utiliza para la decocción de la flor con nuez de betel verde para regular el ciclo menstrual. La columna estaminal es diurética y se utiliza en el tratamiento del problema del riñón. Las hojas estimulan la expulsión de la placenta después del parto. Las raíces son valiosas en la tos.²⁵

Los componentes químicos presentes en las hojas y tallos son β -sitosterol, estigmasterol, acetato de taraxerilo, ciclopropano, Metil esterculado, metil 2-hidroxiesterculado, 2 hidroxiesterculado, Malvalato y beta-sitosterol mientras que las flores contienen flavonoides, cianidin diglucósido, vitaminas, tiamina, riboflavina, niacina, ácido ascórbico y el néctar es rico en aminoácidos, principalmente ácido aspártico y asparagina.²⁶

Los flavonoides son los elementos principales que influyen en la acción antibacteriana, los elementos estructurales necesarios para la acción antibacteriana aún no han sido bien establecidos, no obstante hay un acuerdo de que por lo menos debe presentarse un grupo OH y cierto grado de lipofilicidad. Estos mismos se encuentran en los fungicidas, los cuales ejercen su toxicidad a través de la acidez del grupo hidroxilo por desacoplamiento de la fosforilación oxidativa. Los protones son conducidos a través de la membrana mitocondrial destruyendo el diferencial de protones producidos en el transporte electrónico requerido para la formación de ATP. Para compuestos fenólicos con una dada lipofilicidad, mientras mayor sea su número de grupos hidroxilos, resultarán más eficientes desacopladores, ya que, podrían transferir más protones por molécula. Dado que las bacterias no poseen mitocondrias, este mismo mecanismo es el que podría estar operando en la actividad antibacteriana ejercida por los flavonoides, pero a nivel de membrana citoplasmática.

Dentro de los principios activos de la planta tenemos al fósforo, calcio, nitrógenos, hierro. Vitamina B1, B2, C, flavonoides, ácido cítrico, betacaroteno y fibra soluble (mucílagos).²⁷

1.4. FORMULACIÓN DEL PROBLEMA

¿El extracto etanólico de la flor de *Hibiscus rosa-Sinensis linn* “rosa de china”, tiene efecto antibacteriano sobre cepas de *Escherichia coli* ATCC 25922 comparado con ciprofloxacino a 5 microgramos (μg), en un estudio in vitro?

1.5. JUSTIFICACIÓN DEL ESTUDIO

Las infecciones bacterianas constituyen un problema inminente de salud pública especialmente las que son causadas por *Escherichia coli* debido a que esta bacteria se ha vuelto resistente frente a diversos antibióticos especialmente a la fluoroquinolonas.

Las grandes empresas farmacéuticas en la actualidad se hacen más competitivas tratando de encontrar fármacos con gran cobertura bacteriana adoptando más estrategias a fin de garantizar el éxito.

Ante esta problemática creemos conveniente hacer un estudio experimental con el fin de buscar nuevas alternativas de tratamiento, motivo por el cual esta investigación está orientada en insertar la Flor de “*Hibiscus rosa-Sinensis linn*” como un ícono para la medicina alternativa basándonos en sus principios activos (Flavonoides) los cuales puedan sustituir a los productos químicos.²⁸

De alcanzar su efectividad será difundido y en un futuro podríamos sustituir los productos químicos por productos naturales ofreciendo una mirada integral sobre el beneficio que se puede obtener para la salud del hombre.

1.6. HIPÓTESIS

H₁: El extracto etanólico de la Flor de *Hibiscus rosa-Sinensis linn* “rosa de china” tiene efecto antibacteriano sobre cepas de *Escherichia coli* ATCC 25922 comparado con ciprofloxacino a 5 microgramos (µg), en un estudio in vitro.

H₀: El extracto etanólico de la Flor de *Hibiscus rosa-Sinensis linn* “rosa de china” no tiene efecto antibacteriano sobre cepas de *Escherichia coli* ATCC 25922 comparado con ciprofloxacino a 5 microgramos (µg), en un estudio in vitro.

1.7. OBJETIVOS

1.7.1. OBJETIVO GENERAL

- Evaluar si el extracto etanólico de la flor de *Hibiscus rosa-Sinensis linn* “rosa de china” tiene efecto antibacteriano sobre cepas de *Escherichia coli* ATCC 25922 comparado con ciprofloxacino a 5 microgramos (µg), en un estudio in vitro.

1.7.2. OBJETIVO ESPECÍFICO

- Determinar el efecto antibacteriano del extracto etanólico de la flor de *Hibiscus rosa-Sinensis linn* a una concentración del 100%.
- Determinar el efecto antibacteriano del extracto etanólico de la flor de *Hibiscus rosa-Sinensis linn* a una concentración del 75%.
- Determinar el efecto antibacteriano del extracto etanólico de la flor de *Hibiscus rosa-Sinensis linn* a una concentración del 50%.
- Determinar el efecto antibacteriano del extracto etanólico de la flor de *Hibiscus rosa-Sinensis linn* a una concentración del 25%.
- Determinar el efecto antibacteriano del ciprofloxacino a 5 (µg)

II. MÉTODO

2.1. DISEÑO DE INVESTIGACIÓN Y TIPO DE INVESTIGACIÓN:

TIPO DE INVESTIGACIÓN: Básico.

DISEÑO DE INVESTIGACION: Experimental con repeticiones múltiples con post prueba.

RG1	X1	O1
RG2	X2	O2
RG3	X3	O3
RG4	X4	O4
RG5	X5	O5
RG6	X6	O6

Dónde:

RG: Grupos de estudio: 06

X1: Extracto etanólico de la flor de *Hibiscus rosa-Sinensis linn* al 100%

X2: Extracto etanólico de la flor de *Hibiscus rosa-Sinensis linn* al 75%

X3: Extracto etanólico de la flor de *Hibiscus rosa-Sinensis linn* al 50%

X4: Extracto etanólico de la flor de *Hibiscus rosa-Sinensis linn* al 25%

X5: Control positivo: Ciprofloxacino a 5 microgramos (μg).

X6: Control negativo: Solución salina.

O: Las observaciones de diámetro de halo de inhibición.

2.2. VARIABLES Y OPERALIZACIÓN

VARIABLE INDEPENDIENTE: Agente antibacteriano.

a) Agente antibacteriano no farmacológico: El extracto etanólico de la flor de *Hibiscus rosa-Sinensis linn* “rosa de china”.

b) Agente antibacteriano farmacológico: Ciprofloxacino a 5 μg .

VARIABLE DEPENDIENTE: Efecto antibacteriano.

A) Eficacia: Aumento del halo de inhibición $\geq 21\text{mm}$.²⁹

B) No eficaz: Disminución del halo de inhibición $<21\text{ mm}$.²⁹

OPERACIONALIZACIÓN DE VARIABLES:

VARIABLE	DEFINICIÓN CONCEPTUAL	DEFINICIÓN OPERACIONAL	INDICADORES	ESCALA DE MEDICIÓN
V. I: Agente antibacteriano	Principio activo que inhibe el crecimiento bacteriano.	La población se dividió en los siguientes 6 grupos: a) Extracto etanólico al 100% b) Extracto etanólico 75% c) Extracto etanólico 50% d) Extracto etanólico 25% e) Ciprofloxacino f) Solución salina	RG1 RG2 RG3 RG4 RG5 RG6	Cualitativa nominal
V. D: Efecto antibacteriano	Se midió mediante el incremento del halo de inhibición, según el método de Kirby Bauer. ³⁰	Se considera: a) Sensible ≥ 21 mm. b) Intermedio o indiferente 16-20mm. c) Resistente ≤ 15 mm. ²⁹	Eficaz (≥ 21 mm). No eficaz (<21mm).	Cualitativa nominal

2.3. POBLACIÓN Y MUESTRA

POBLACIÓN:

Estuvo constituida por todas las cepas de *Escherichia coli* ATCC 25922 cultivados en el laboratorio clínico “San José”.

MUESTRA:

Tamaño de muestra: Se empleó la formula estadística de diferencia de promedio sobre halos de inhibición, para hallar el número de placas necesarias que validen la investigación se consideró 10 repeticiones por cada grupo a experimentar.³¹ **(Ver anexo 01)**

Unidad de análisis: Formado por cada colonia sembrado en las placas Petri con las cepas de *Escherichia coli* ATCC 25922.

Unidad de muestra: Cada placa Petri en el cual estuvo los cultivos con cepas de *Escherichia coli* ATCC 25922.

Muestreo: Se trabajó con todas las cepas cultivadas en las placas Petri.

CRITERIOS DE SELECCIÓN:

Criterios de inclusión:

- Placas con siembra apropiada de *Escherichia coli* ATCC 25922 (3×10^8 UFC/mL) previa a la exposición con el extracto etanólico de la flor de *Hibiscus rosa-Sinensis* linn.

Criterios de exclusión:

- Se excluyó a las placas que luego del período de incubación, se contaminaron por diferentes tipos de microorganismos y/o no muestren crecimiento bacteriano.

2.4. TÉCNICAS E INSTRUMENTOS DE RECOLECCIÓN DE DATOS, VALIDEZ Y CONFIABILIDAD

LA TÉCNICA: Consistió en la observación directa del campo experimental.

PROCEDIMIENTO: (Ver anexo 02)

- a. Identificación taxonómica de la planta por la UNT
- b. Tratamiento de la muestra
- c. Obtención del extracto etanólico con el método de maceración en etanol.³⁰
- d. Preparación del medio de cultivo con el método de Mueller-Hinton
- e. Determinación de la susceptibilidad mediante el método de Kirby-Bauer.

INSTRUMENTO:

Se observó la ficha de recojo de información donde se describió el número de placas Petri a utilizarse, diluciones y la medición de los halos de inhibición (mm). **(Ver anexo 03).**

VALIDACIÓN Y CONFIABILIDAD DEL INSTRUMENTO

Se realizó por tres expertos que garantizaron que los datos recolectados cumplieron con los criterios de evaluación y el logro de los objetivos del estudio. **(Ver anexo 04)**

2.5. MÉTODOS DE ANÁLISIS DE DATOS

Los datos de los halos de inhibición (mm) de los cultivos fueron analizados en el programa SPSS versión 25. Se aplicó las pruebas estadísticas: la prueba de varianza unidireccional (ANOVA) y post ANOVA de Tukey para precisar las disimilitudes significativas de cada diseño experimental en relación del grupo control.

2.6. ASPECTOS ÉTICOS:

El estudio se realizó respetando los criterios de las Normas de Ética en la investigación considerados en la Declaración de Helsinsky³², considerando que es un estudio descriptivo, se preservó la confidencialidad y la información obtenida, sólo tendrá acceso a ella el personal investigador. Las técnicas de Bioseguridad serán tomadas del manual del Ministerio de Salud.³³ Se obtendrá también la aprobación del Comité de Investigación de la Facultad de Ciencias Médicas de la Universidad César Vallejo de Trujillo.

III. RESULTADOS

Tabla 1. Efecto antibacteriano del extracto etanólico de la flor *Hibiscus rosa-Sinensis linn* “rosa de china” sobre cepas de *Escherichia coli* ATCC 25922 comparado con ciprofloxacino a 5 (µg), estudio in vitro.

Datos Descriptivos								
Tratamiento	N	Media	Desv. Estándar	Desv. Error	95% del intervalo de confianza para la media		Mínimo	Máximo
					Límite inferior	Límite superior		
100%	10	13.10	1.197	0.379	12.24	13.96	11	15
75%	10	8.60	0.699	0.221	8.10	9.10	8	10
50%	10	7.80	0.789	0.249	7.24	8.36	7	9
25%	10	2.70	3.498	1.106	0.20	5.20	0	7
Ciprofloxacino	10	28.10	1.370	0.433	27.12	29.08	25	30
Total	50	12.06	8.934	1.263	9.52	14.60	0	30

Fuente: Reporte de resultados del SPSS Ver. 25

TABLA 2. Efecto antibacteriano del extracto etanólico de la flor *Hibiscus rosa-Sinensis linn* “rosa de china” sobre cepas de *Escherichia coli* ATCC 25922 comparado con ciprofloxacino a 5 µg, estudio in vitro.

Análisis de varianza (ANOVA)

	Suma de cuadrados	gl	Media cuadrática	F	Sig.
Entre grupos	3760.920	4	940.230	282.257	0.000
Dentro de grupos	149.900	45	3.331		
Total	3910.820	49			

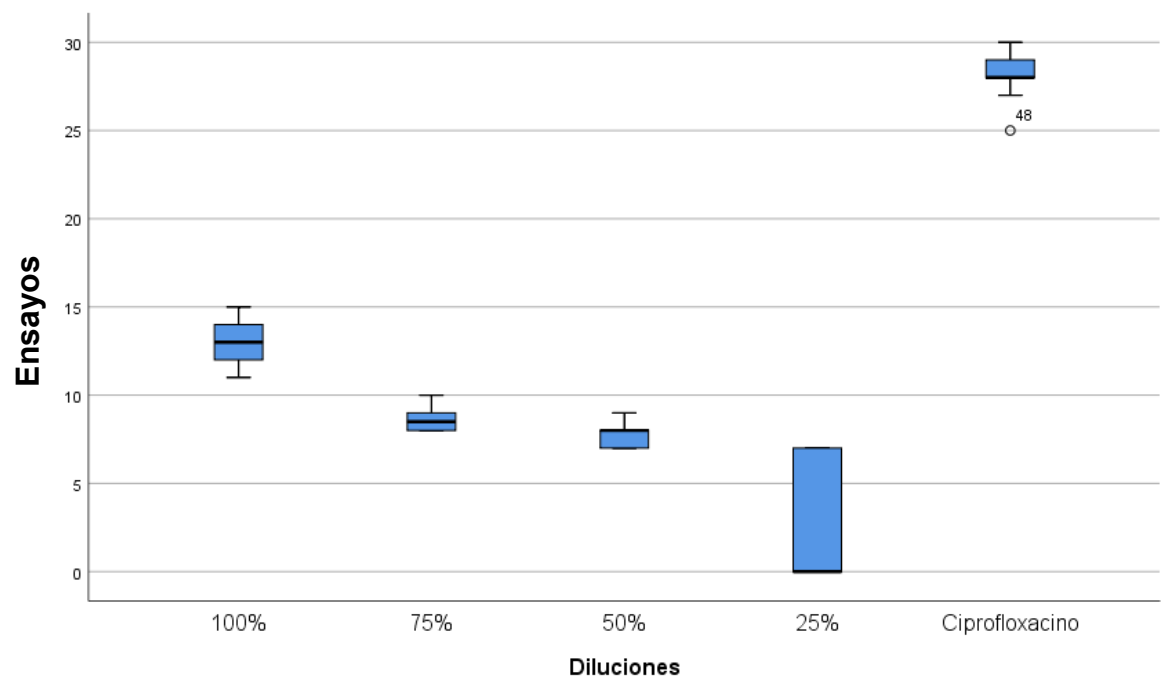
Fuente: Reportes de resultados del SPSS Ver. 25

TABLA 3. Efecto antibacteriano del extracto etanólico de la flor *Hibiscus rosa-Sinensis linn* “rosa de china” sobre cepas de *Escherichia coli* ATCC 25922 comparado con ciprofloxacino a 5 µg, estudio in vitro.

ANÁLISIS DE HOMOGENEIDAD DE LOS DATOS: TUKEY

Diluciones	N	Subconjunto para alfa = 0.5			
		1	2	3	4
25%	10	2.70			
50%	10		7.80		
75%	10		8.60		
100%	10			13.10	
Ciprofloxacino	10				28.10
Sig.		1.000	0.863	1.000	1.000
Se visualizan las medias para los grupos en los subconjuntos homogéneos.					
a. Utiliza el tamaño de la muestra de la media armónica = 10.000.					

Fuente: Reportes de resultados del SPSS Ver. 25



Fuente: Reportes de resultados del SPSS Ver. 25

Gráfico 01. Efecto antibacteriano del extracto etanólico de la flor *Hibiscus rosa-Sinensis linn* “rosa de china” sobre cepas de *Escherichia coli* ATCC 25922 comparado con ciprofloxacino 5 µg, estudio in vitro.

IV. DISCUSIÓN

Con el objetivo de evaluar el efecto antimicrobiano del extracto etanólico de la flor de *Hibiscus rosa-Sinensis linn* sobre *Escherichia coli* ATCC 25922 comparado con ciprofloxacino a 5 µg, en un estudio in vitro, donde se observó 10 placas con un total de 50 cultivos. En cada placa Petri se colocaron un total de 5 discos de los cuales 4 de ellos presentaban los extractos etanólico de la flor de Hibiscus rosa-Sinensis (rosa de china) a distintas concentraciones (100%, 75%, 50%, 25%) y un disco de ciprofloxacino como grupo de control positivo (Tratamiento estándar) y suero fisiológico (SF) DMSO como grupo de control negativo. El suero fisiológico (DMSO) no se la consideró dentro de los datos estadísticos por tener un valor nulo en los 50 cultivos.

En relación al efecto antibacteriano del extracto etanólico de la flor de *Hibiscus rosa-Sinensis linn* sobre *Escherichia coli* ATCC 25922 (Tabla 01), se evidenció que el extracto etanólico de la flor de *Hibiscus rosa-Sinensis linn* a la concentración de 25% tiene un halo de inhibición de 2.70 mm (DS: 3.498 ± 1.106 . IC 95%: 0.20 a 5.20 con intervalos de 0 a 7 mm). A la concentración de 50% tiene un halo de inhibición de 7.80 mm (DS: 0.789 ± 0.249 . IC 95%: 7.24 a 8.36 con intervalos de 7 a 9 mm). Al 75% muestra un halo de inhibición de 8.60 mm (DS: 0.699 ± 0.221 . IC 95%: 8.10 a 9.10 con intervalos de 8 a 10 mm), siendo el mayor el halo de inhibición a la concentración del 100% con 13.10 mm (DS: 1.197 ± 0.379 . IC 95%: 12.24 a 13.96 con intervalos de 11 a 15 mm) y el grupo control de ciprofloxacino tuvo un halo de inhibición de 28.10 mm (DS: 1.370 ± 0.433 . IC 95%: 27.12 a 29.08 con intervalos de 25 a 30 mm).

Al hacer el análisis de ANOVA en la Tabla 02 el resultado (ANOVA = 0.000) mostró que el experimento estadísticamente es altamente significativo (ANOVA menor de 0.01), indicando que la información recolectada mostraba que había diferencia entre los grupos, esto se corrobora con el Test de Tukey (Tabla 03) donde demuestra la homogeneidad de los grupos y nos indica cual es el grupo que tuvo mayor eficacia, en este caso fue el de

ciprofloxacino, seguido del extracto etanólico de la flor de *Hibiscus rosa-Sinensis linn* al 100%. Los valores de los halos de inhibición de la planta, encontrados en el estudio no superan los del CLSI (≥ 21 mm), considerándose como resistente frente a *E. coli*.

Según Agarwal S, et al⁸ (India, 2014), que encontró un halo de inhibición de $18,00 \pm 1,53$ mm, Ali Z, et al⁹ (Pakistán, 2014), el cual obtuvo un halo de 16.75 ± 2.10 mm, y así mismo Sangeetha A, et al¹⁴ (Malasia, 2009), que obtuvo un halo de $18,6 \pm 2.85$ mm, muestran que el extracto de *Hibiscus rosa-Sinensis linn* tienen mayor halo de inhibición comparado con el de nuestro estudio, según lo manifiestan los autores, Pero si comparamos con el padrón del CLSI estarían en la categoría de indiferente .

Por otro lado Umiya S, et al⁶ (India, 2015), encontró un halo de inhibición de 11 mm, Tiwari U, et al⁷ (India, 2015), el cual obtuvo un halo de 13.75 ± 0.99 mm, así mismo Ruban P, et al¹² (India, 2012), que obtuvo un halo de $14,30 \pm 2,86$ mm y Uddin B, et al¹³ (Bangladés, 2010) que logró obtener un halo de 13 mm, demuestran que los halos de inhibición obtenidos fueron menores a lo observado en nuestro estudio.

Por último se considera que las diferencias encontradas entre los resultados de los antecedentes y los resultados de nuestra investigación, se puede deber a al procedimiento de la destilación o técnica de las pruebas de sensibilidad, así mismo a diversos factores como el clima, el tipo de suelo en la que se recolecta, etc. Estas condiciones se muestran en los resultados obtenidos ya que afectan directamente a las concentraciones de minerales, micronutrientes, entre otros elementos que contribuyen su actividad antibacteriana. Por lo tanto, la planta pese a tener algún efecto antibacteriano no se evidencia que pueda ser utilizado como un producto independiente, el ciprofloxacino continúa evidenciando efecto antibacteriano eficaz sobre cepas de *Escherichia coli*; no obstante, ésta investigación es un aporte a contribuir nuevos estudios y por ende mejores resultados para poder obtener nuevos tratamientos contra *Escherichia coli*.

V. CONCLUSIONES

- El extracto etanólico de la flor *Hibiscus rosa-Sinensis linn* evidenció tener efecto antibacteriano pero menor que el ciprofloxacino, comparado con los criterios CLSI (≥ 21 mm).
- Se observó que a mayor concentración del extracto etanólico de la flor *Hibiscus rosa-Sinensis*, mayor es el efecto antibacteriano.
- El Ciprofloxacino mostró mejor efecto antibacteriano con un halo de inhibición que duplico al del extracto etanólico de la flor *Hibiscus rosa-Sinensis linn*.

VI. RECOMENDACIONES

- Continuar el estudio analizando el efecto antimicrobiano sobre otras bacterias Gram positivas y Gram negativas.
- Se podría utilizar el extracto etanólico como coadyuvante con un antibiótico para ver si es que hay un efecto de potenciación.
- Evaluar su efecto antibacteriano en animales vivos como animales pequeños en el bioterio (*rattus rattus* de experimentación).
- Ampliar el estudio para determinar los componentes activos que pueda tener esta planta al actuar como antimicrobiano.

VII. REFERENCIA BIBLIOGRÁFICA

1. Organización Mundial de la Salud [Página principal en Internet]. Ginebra: OMS; c2007 [actualizado 30 Abril 2014; citado 14 Abril 2017]. [aprox. 1 pantalla]. URL disponible en:
<http://www.who.int/mediacentre/news/releases/2014/amr-report/es/>
2. Dielubanza E, Schaeffer A. Urinary Tract Infections in Women. The Medical clinics of North America. Estados Unidos. [En línea] 2011; 95 (1): 27 – 41. [Fecha de acceso 29 de Abril del 2017]. URL disponible en:
https://www.researchgate.net/publication/49626607_Urinary_Tract_Infections_in_Women
3. Álvarez L. Infecciones de vías urinarias en el Hospital Universidad del Norte. Salud Uninorte. Colombia. [En línea] 2007; 23 (1): 9 – 18. [Fecha de acceso 29 de Abril del 2017]. URL disponible en:
<http://rcientificas.uninorte.edu.co/index.php/salud/article/viewArticle/4050/5707>
4. Montañez V. Raúl Antonio: Infección urinaria alta comunitaria por E. coli resistente a ciprofloxacino: características asociadas en pacientes de un hospital nacional en Perú. Anales de la Facultad de Medicina. [Revista en Internet]. 2015 [Consultado 14 Abril 2017]; 76(4). Disponible en:
http://www.scielo.org.pe/scielo.php?pid=S102555832015000500009&script=sci_arttext
5. Abhishek K, Dudeja S, Chauhan R, Hemalata, Sunena, Vikas B, Vinod C, Anil K. Antimicrobial activity of ethno-medicinal plants against cariogenic pathogens. Journal of Medicinal Plants Studies. India. [En línea] 2016. [Fecha de acceso 22 de Abril del 2017]. URL disponible en:
<http://www.plantsjournal.com/archives/2016/vol4issue3/PartD/4-4-37-333.pdf>

6. Umiya S. Antibacterial activity of Hibiscus rosa sinensis and Calendula officinalis flowers extract against various Pathogen. International Journal of Scientific Research in Biological Sciences. India. [En línea] 2015; 2 (3): 5 – 8. [Fecha de acceso 22 de Abril del 2017]. URL disponible en:
http://www.isroset.org/pub_paper/IJSRBS/2-ISROSET-IJSRBS-Nidhi%20Pal.pdf
7. Tiwari U, Poonam Y, Darshika N. Study on Phytochemical Screening and Antibacterial Potential of Methanolic Flower and Leaf Extracts of Hibiscus rosa sinensis. International Journal of Innovative and Applied Research. India. [En línea] 2015; 3 (6): 9 – 14. [Fecha de acceso 22 de Abril del 2017]. URL disponible en:
https://www.researchgate.net/publication/281147543_Study_on_Phytochemical_Screening_and_Antibacterial_Potential_of_Methanolic_Flower_and_Leaf_Extracts_of_Hibiscus_rosa_sinensisUdita_Tiwari_Poonam_Yadav_and_Darshika_NigamInternational_Journal_of_Innova
8. Agarwal S, Rachna P. Evaluation of Antibacterial activity of Hibiscus rosa-sinensis flower extract against E. coli and B. subtilis. Biological Forum – An International Journal. India. [En línea] 2014; 6 (2): 194 – 196. [Fecha de acceso 22 de Abril del 2017]. URL disponible en:
<http://www.researchtrend.net/bfij/bf12/32%20DR%20SHASHI%20AGARWAL%20&%20DR%20RACHNA%20PRAKASH.pdf>
9. Ali Z, Syed Al, Ammara M, Zaib H, Sohail A, Asim M, Matloob A, Ameer F, Iftikhar H, Muhammad R, Nasir M, Muhammad Y. Antioxidant and antibacterial activities of *Hibiscus Rosa-sinensis* Linn flower extracts. Pakistan journal of pharmaceutical sciences. Pakistán. [En línea] 2014; 27 (3): 469 – 474. [Fecha de acceso 22 de Abril del 2017]. URL disponible en:
http://applications.emro.who.int/imemrf/Pak_J_Pharm_Sci/Pak_J_Pharm_Sci_2014_27_3_469_474.pdf
10. Jayakumar V, Arunmozhi V. ANTIBACTERIAL ACTIVITY OF HIBISCUS ROSA-SINENSIS AND ROSA DAMASCENA PETALS AGAINST DENTAL

PATHOGEN. International Journal of Integrative sciences, Innovation and Technology. India. [En línea] 2014; 3 (3): 01 – 06. [Fecha de acceso 22 de Abril del 2017]. URL disponible en:

http://www.academia.edu/12919946/ANTIBACTERIAL_ACTIVITY_OF_HIBISCUS_ROSASINENSIS_AND_ROSA_DAMASCENA_PETALS_AGAINST_DENTAL_PATHOGEN

11. Wei Y, Li O, Rosma A, Rajeev B. Antioxidant and antibacterial activities of hibiscus (*Hibiscus rosa-sinensis* L.) and Cassia (*Senna bicapsularis* L.) flower extracts. Journal of King Saud University – Science. Malasia. [En línea] 2013; 3 (3): 01 – 06. [Fecha de acceso 22 de Abril del 2017]. URL disponible en:
<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1018364712000638>
12. Ruban P, Gajalakshmi K. In vitro antibacterial activity of *Hibiscus rosa-sinensis* flower extract against human pathogens. Asian Pacific journal of tropical biomedicine. India. [En línea] 2012; 25 (4): 275 – 282. [Fecha de acceso 22 de Abril del 2017]. URL disponible en:
<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1018364712000638>
13. Uddin B, Tareq H, Sudip P, Tanzir A, Talisma N, Sohel A. Antibacterial activity of the ethanol extracts of *Hibiscus rosa-sinensis* leaves and flowers against clinical isolates of bacteria. Department of Biochemistry and Molecular Biology, Jahangirnagar University Savar. Bangladesh. [En línea] 2010; 22 (2): 65 – 73. [Fecha de acceso 22 de Abril del 2017]. URL disponible en:
http://www.academia.edu/27256553/Antibacterial_activity_of_the_ethanol_extract_of_Hibiscus_rosa-sinensis_leaves_and_flowers_against_clinical_isolates_of_bacteria
14. Sangeetha A, Zubaidah Z, Dayang F. Preliminary screening of antibacterial activity using crude extracts of *Hibiscus rosa sinensis*. Diagnostic & Applied Health Sciences. Malasia. [En línea] 2009; 20 (2): 109 – 118. [Fecha de acceso 22 de Abril del 2017]. URL disponible en:

<https://ukm.pure.elsevier.com/en/publications/preliminary-screening-of-antibacterial-activity-using-crude-extra>

15. Organización Mundial de la Salud [Página principal en Internet]. Ginebra: OMS; c2007 [actualizado 30 Abril 2014; citado 30 Abril 2017]. [aprox. 1 pantalla]. Disponible en: http://www.who.int/topics/infectious_diseases/es/.
16. Ledermann W. Una historia personal de las bacterias. Chile: RIL; 2007 [consultado: 14 de Abril del 2017]. Disponible en: <https://books.google.com.pe/books?id=pydkwNBz9dEC&pg=PA247&dq=theodore+von+escherich+biografia&hl=es419&sa=X&ved=0ahUKEwjRt4qGkqnTAhWBMMyYKHZ94AtAQ6AEIJDA#v=onepage&q&f=false>
17. Brooks G., Carroll K., Butel J., Norse S., Mietzner., Microbiología Médica- Jawetz, Melnick y Adelberg 25ª ed. EE.UU. McGraw Hill; 2011.
18. De La Rosa M., Prieto J., Navarro J., Microbiología en ciencias de la salud. 3ª ed. España. Elsevier; 2011.
19. Murray P., Rosenthal, K., Pfaller M. Microbiología Médica. 6ª ed. España Elsevier; 2009.
20. Torres A. Pathogenic *Escherichia Coli* in Latin America. 1ª ed. EE.UU; Bentham Science Publishers Ltd; 2010.
21. Goodman y Gilman. Las Bases Farmacológicas de la Terapéutica. 12ª ed. California: Ed. MCGRAW HILL; 2012
22. Pedro Lorenzo P., Moreno A., Leza J., Lizasoain I., Moro M., Portolés A. Velázquez. Farmacología Básica y Clínica [en línea]. España: Panamerica; 2009. [fecha de acceso 29 de Abril de 2017]. URL disponible en: https://books.google.com.pe/books?id=BeQ6D40wTPQC&printsec=frontcover&dq=ciprofloxacino+libro+de+farmacologia&hl=es-419&sa=X&ved=0ahUKEwjO_dq2_c7TAhWCOSYKHcQUCTAQ6AEIITAA#v=onepage&q=ciprofloxacino&f=false

23. Enciclopedia de las medicinas alternativas, 1ª ed. España: Océano; 2006.
24. Khare C., Indian Medicinal Plants. 1ª ed. India: Springer; 2008.
25. Bokhtear U. Bangladés. [En línea] 2011. [Fecha de acceso 29 de Abril del 2017]. URL disponible en: <http://www.mpbd.info/plants/hibiscus-rosa-sinensis.php>
26. Raimundo C. HERBARIO VIRTUAL DE BANYERES DE MARIOLA Y ALICANTE [Internet]. Alicante: Raimundo C. 2011. [Fecha de acceso 29 de abril del 2017]. URL disponible en: <http://herbariovirtualbanyeres.blogspot.com/2011/11/hibiscus-rosa-sinensis-hibisco-hibisc.html>
27. Velasquez I. Venezuela. [En línea] 2008. [Fecha de acceso 29 de Abril del 2017]. URL disponible en: <http://acupunturaparatodos.blogspot.com/2008/11/noviembre-2008.html>
28. Antibacterial Activity of Hibiscus rosa-sinensis Extract and Synergistic Effect with Amoxicillin against some Human Pathogens. Iraq [En línea] 2017 [Fecha de acceso 11 de noviembre del 2017]. URL disponible en: <http://www.imedpub.com/articles/antibacterial-activity-of-hibiscus-rosasinensisextract-and-synergistic-effect-withamoxicillin-against-some-human-pathogens.pdf>
29. Patel J. Cockerill F, Bradford P, Eliopoulos G, Hindler J, Jenkins G et al. Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing; Twenty – Seventh informational Supplement. CLSI document M100- S27. Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standards institute; 2017. [Fecha de acceso 11 de noviembre del 2016]. URL disponible en: <http://ljzx.cqrmhospital.com/upfiles/201601/20160112155335884.pdf>
30. Ministerio de Salud del Perú. Manual de procedimientos para la prueba de sensibilidad antimicrobiana por el método de disco difusión. Lima:

Ministerio de Salud, Instituto Nacional de Salud; 2002. [citado: 1 de junio del 2017]. Disponible en URL:

<http://www.ins.gob.pe/insvirtual/images/otrpubs/pdf/manual%20sensibilidad%202.pdf>

31. Diaz A. Diseño estadístico de experimentos. Colombia. 2ª ed. Ed. Universidad de Antioquia; 2009.

32. Williams J. R. The declaration of Helsinki and public Health. Bulletin of the World Health Organization. [En línea]. 2008; 86:650-651 [Fecha de acceso 11 de Noviembre del 2016]. URL disponible en: <http://www.who.int/bulletin/volumes/86/8/en/>

33. Ministerio de Salud Manual de Bioseguridad DGSP- V 01 Sistema de Gestión de la calidad del PRONAHEBAS. Perú. [En línea] 2004. [Fecha de acceso 11 de noviembre del 2016]. URL disponible en: <http://www.minsa.gob.pe/dgsp/observatorio/documentos/infecciones/MANUAL%20DE%20BIOSEGURIDAD.pdf>.

VIII. ANEXOS

ANEXO 01

TAMAÑO DE MUESTRA

$$n = \frac{(z_{\alpha/2} + Z_{\beta})^2 2\sigma^2}{(\bar{X}_1 - \bar{X}_2)^2}$$

Donde:

$$Z_{\alpha/2} = 1.96$$

$$Z_{\beta} = 0.84$$

$$\bar{X}_1 = 21 \text{ mm, Diámetro del halo de inhibición del Ciprofloxacino }^{29}$$

$$\bar{X}_2 = 23.08 \text{ mm, Diámetro de halo de inhibición del extracto etanólico de la flor } \textit{Hibiscus rosa-Sinensis linn} \text{ “rosa de china” }^{10}$$

$$\sigma = 1.645 \text{ mm}$$

Reemplazando:

$$n = \frac{(1.96 + 0.84)^2 * 2(1.645)^2}{(21 - 23.08)^2}$$

$$n = \frac{(2.8)^2 * 2(2.71)}{(2.08)^2}$$

$$n = \frac{7.84 * 5.42}{4.33}$$

$$n = 9.81$$

$$n = 10 \text{ repeticiones}$$

ANEXO 02

OBTENCIÓN DEL EXTRACTO ETANÓLICO DE LA FLOR *Hibiscus rosa-Sinensis linn* “rosa de china”

PROCEDIMIENTO

a) Certificación de la planta por la UNT



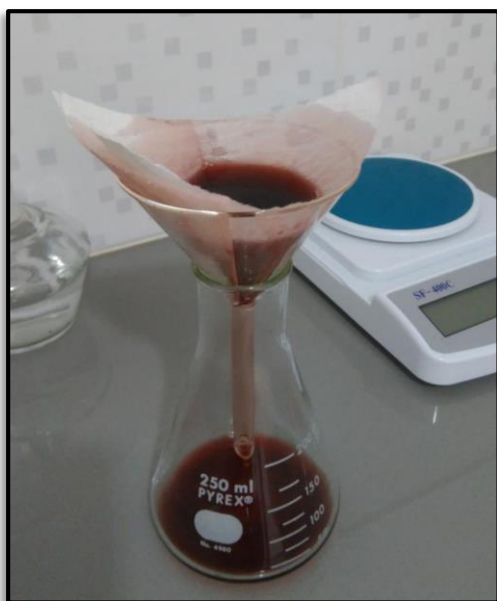
b) Tratamiento de la muestra

Las plantas frescas de la flor de *Hibiscus rosa-Sinensis linn* “rosa de china”, se obtuvieron en el mercado La Hermelinda de Trujillo, procedentes de la localidad de Trujillo, en una cantidad de 1 a 2 Kg aproximadamente y se llevaron al laboratorio de Microbiología de la Universidad César Vallejo de Trujillo, donde se seleccionaron los ejemplares con buenas condiciones; de este modo, se obtuvo la “muestra fresca” (MF). La MF se lavó con agua destilada clorada, se colocó sobre una bandeja de cartulina y se llevó a un horno a 40-45°C por 3-4 días donde se deshidrató. Después, se estrujó manualmente el vegetal seco hasta que se obtuvo partículas muy pequeñas y se reservó almacenándolas herméticamente en bolsas negras. A esto se le consideró como “muestra seca” (MS).



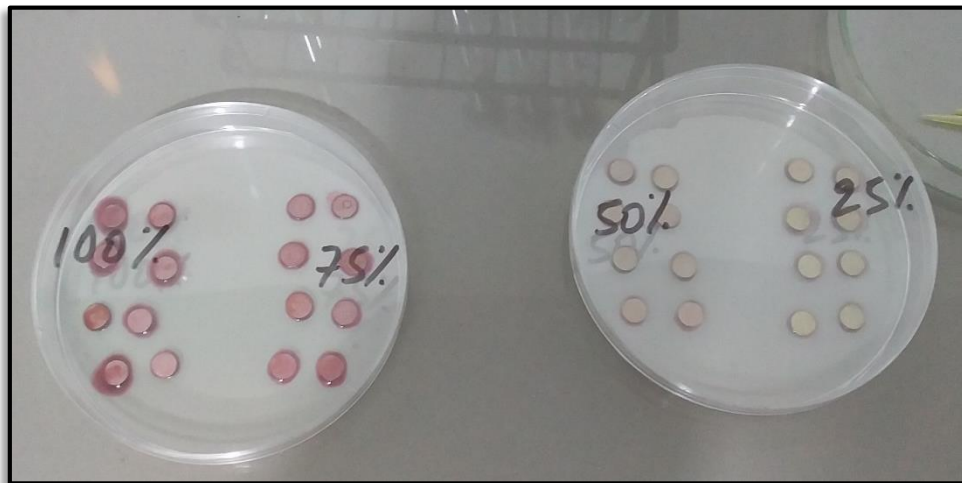
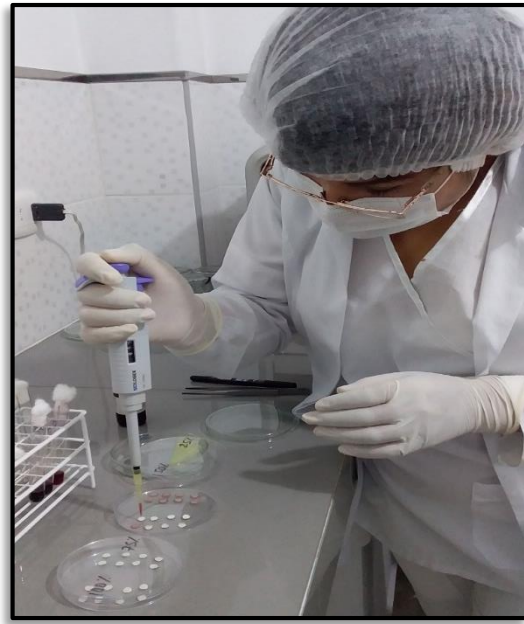
c) Obtención del extracto etanólico

El extracto etanólico de la flor de *Hibiscus rosa-Sinensis linn* se obtuvo por el método de maceración en etanol de 96°; para ello, se colocó en un frasco de vidrio 20 g de MS y 100 ml de etanol, se tapó el frasco herméticamente y se cubrió totalmente con papel aluminio. Luego, se dejó en lugar fresco y seco, a temperatura ambiente, por 8 días con agitación de 3 a 4 veces diarias. Después, se hizo una doble filtración. Primero se filtró a través de una gasa estéril y segundo a través de un papel filtro Whatman N°41. Este filtrado, se evaporó por ventilación con corrientes de aire frío en circuito cerrado en estufa, por 1 a 2 días, hasta que quede a una concentración mayor a 100 mg/mL. De este modo, se obtuvo el extracto etanólico (EE) considerado al 100%; el cual, se reservó en un frasco de vidrio ámbar a 4°C–6°C hasta su utilización.



d) Preparación del medio de cultivo

Se utilizó agar Mueller-Hinton como medio de cultivo. Se preparó suficiente medio para 10 placas Petri. Este medio de cultivo se esterilizó en autoclave a 121°C por 15 minutos. Después, se sirvió en Placas Petri estériles de plástico desechables, 18-20 ml por cada placa, y se dejó reposar hasta que solidificó completamente.



e) Prueba de susceptibilidad (Prueba de Disco difusión en agar)

Se evaluó utilizando el método de Kirby-Bauer de disco difusión en agar. Para ello, se consideró los criterios del Clinical and Laboratory Standards Institute - CLSI de Estados Unidos de América. Se tomó en cuenta los estándares M02-A12 y M100.

1) Preparación del inóculo

El inóculo se preparó colocando 3-4 ml de suero fisiológico en un tubo de ensayo estéril, al cual se le adicionó una alícuota del microorganismo de la

flor de *Hibiscus rosa-Sinensis linn*, cultivado hace 18-20 horas, de tal modo que se observó una turbidez equivalente al tubo 0,5 de la escala de McFarland ($1,5 \times 10^8$ UFC/ml aprox.)

2) Siembra del microorganismo

Se sembró el microorganismo la flor de *Hibiscus rosa-Sinensis linn*, embebiendo un hisopo estéril en el inóculo y deslizándolo sobre toda la superficie del medio de cultivo en las Placas Petri (siembra por estrías en superficie); de tal modo, que el microorganismo quedó como una capa en toda la superficie.

3) Preparación de las concentraciones del EE

A partir del EE, se prepararon 4 concentraciones (100%, 75%, 50% y 25%) utilizando como solvente Dimetil Sulfóxido (DMSO); para ello, se rotularon 4 tubos de ensayo de 13x100mm estériles con las 4 concentraciones y se colocó 750 µL de EE y 250 µL de DMSO al tubo de 75%, 500 µL de EE y 500 µL de DMSO al tubo de 50%, y 250 µL de EE y 750 µL de DMSO al tubo de 25%.

4) Preparación de los discos de sensibilidad con EE

A partir de cada una de las concentraciones, se colocó 10 µL en cada disco de papel filtro Whatman N° 1 de 6mm de diámetro, previamente esterilizados. Se tomó 10 µL de EE al 25% y se colocó en un disco, 10 µL de AE al 50% en otro disco, 10 µL de EE al 75% en otro disco y 10 µL de EE al 100% en otro disco. Esto se repitió por 10 veces.

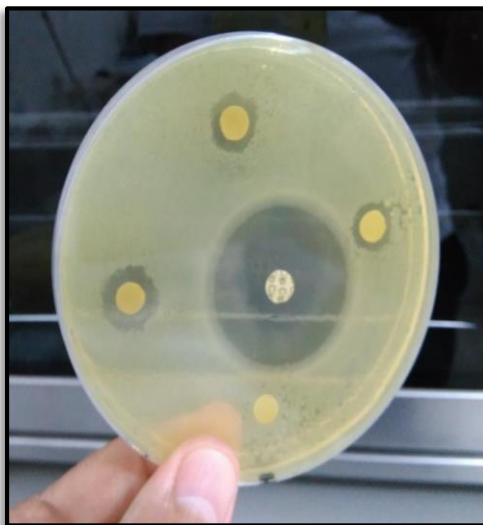
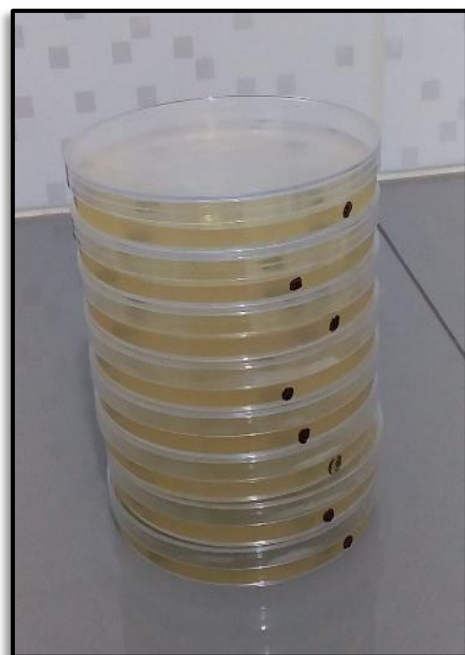
5) Confrontación del microorganismo con el agente antimicrobiano

Con la ayuda de una pinza metálica estéril, se tomaron los discos de sensibilidad preparados, uno de cada concentración con EE, y se colocaron en la superficie del agar sembrado con el microorganismo de la flor de *Hibiscus rosa-Sinensis linn*, de tal modo que quedaron los discos (uno de cada concentración) a un cm del borde de la Placa Petri y de forma equidistante. Adicionalmente, se colocó el disco con Ciprofloxacino (control

positivo). Se dejaron en reposo por 15 min y después las placas se incubaron de forma invertida en la estufa a 35-37°C por 18-20 horas.

6) Lectura e interpretación

La lectura se realizó observando y midiendo con una regla Vernier, el diámetro de la zona de inhibición de crecimiento microbiano. Esta medición se realizó para cada una de las concentraciones de EE de la flor de *Hibiscus rosa-Sinensis linn* y para el Ciprofloxacino. Se interpretó como sensible o resistente, según lo establecido en el Estándar M100 del CLSI.



ANEXO 03

FICHA DE RECOLECCION DE DATOS

FICHA DE RECOLECCION DE DATOS PARA MEDIR EL TAMAÑO DE LOS HALOS DE INHIBICION (mm) SOBRE CEPAS DE *Escherichia coli* ATCC 25922

PATOGENO <i>Escherichia coli</i> ATCC 25922	CONCENTRACION DEL EXTRACTO ETANÓLICO DE <i>Hibiscus rosa-Sinensis linn</i> <i>“rosa de china”</i>				CONTROL POSITIVO	CONTROL NEGATIVO
	100%	75%	50%	25%	CIPROFLOXACINO 5ug	Suero Fisiológico
	Diámetro del halo de inhibición (mm)					
PLACA 1	14	9	8	0	29	0
PLACA 2	13	8	7	7	27	0
PLACA 3	11	9	8	0	28	0
PLACA 4	13	10	9	0	29	0
PLACA 5	14	8	9	7	28	0
PLACA 6	12	9	8	6	29	0
PLACA 7	12	8	7	7	30	0
PLACA 8	13	8	8	0	25	0
PLACA 9	14	8	7	0	28	0
PLACA 10	15	9	7	0	28	0
Promedio del diámetro del halo de inhibición	13	9	8	3	28	0

ANEXO 04

VALIDACIÓN Y CONFIABILIDAD DEL INSTRUMENTO

Servicio de Microbiología del Hospital ...	Validación de métodos moleculares	PNT-VV-01
		Edición N° 01 Página 7-7

Anexo 1. Protocolo de validación de métodos microbiológicos

Nº de Protocolo:	Responsable:
------------------	--------------

1. Objetivos del estudio

2. Fecha de realización

3. Alcance de la validación
Analito (ej. agente infeccioso)
Muestra
Rango de trabajo
Procedimiento de ensayo
Tipo de Método
Nombre y código de los equipos empleados

4. Parámetros de Validación	5. Criterios de aceptación
<input type="checkbox"/> Selectividad/Especificidad <input type="checkbox"/> Límite de detección <input type="checkbox"/> Límite de cuantificación <input type="checkbox"/> Intervalo de linealidad <input type="checkbox"/> Precisión: Repetibilidad <input type="checkbox"/> Precisión: Reproducibilidad <input type="checkbox"/> Exactitud <input type="checkbox"/> Otros	% aciertos % fallos LD = LC = $R^2 \geq$ $CV\% \geq$ $CV\% \geq$ $EM \leq$ Indicar

6. Relación de experimentos						
<table border="1"> <tr> <td>Descripción</td> <td>Límite de Detección</td> </tr> <tr> <td>Descripción</td> <td>Selectividad / Especificidad</td> </tr> <tr> <td>Descripción</td> <td>Parámetro</td> </tr> </table>	Descripción	Límite de Detección	Descripción	Selectividad / Especificidad	Descripción	Parámetro
Descripción	Límite de Detección					
Descripción	Selectividad / Especificidad					
Descripción	Parámetro					

7. Observaciones

Cargo
Firma
Fecha

ANEXO 05

Tabla: PRUEBAS POST-HOC PARA COMPARAR EL EXTRACTO ETANÓLICO DE LAS FLORES DE *Hibiscus rosa-Sinensis* linn “rosa de china” SOBRE CEPAS DE *Escherichia coli* ATCC 25922 CON CIPROFLOXACINO

Comparaciones múltiples						
Variable dependiente: Concentración de extracto etanólico						
HSD Tukey						
(I) Diluciones		Diferencia de medias (I-J)	Desv. Error	Sig.	Intervalo de confianza al 50%	
					Límite inferior	Límite superior
100%	75%	4.500*	0.816	0.000	3.19	5.81
	50%	5.300*	0.816	0.000	3.99	6.61
	25%	10.400*	0.816	0.000	9.09	11.71
	Ciprofloxacino	-15.000*	0.816	0.000	-16.31	-13.69
75%	100%	-4.500*	0.816	0.000	-5.81	-3.19
	50%	0.800	0.816	0.863	-0.51	2.11
	25%	5.900*	0.816	0.000	4.59	7.21
	Ciprofloxacino	-19.500*	0.816	0.000	-20.81	-18.19
50%	100%	-5.300*	0.816	0.000	-6.61	-3.99
	75%	-0.800	0.816	0.863	-2.11	0.51
	25%	5.100*	0.816	0.000	3.79	6.41
	Ciprofloxacino	-20.300*	0.816	0.000	-21.61	-18.99
25%	100%	-10.400*	0.816	0.000	-11.71	-9.09
	75%	-5.900*	0.816	0.000	-7.21	-4.59
	50%	-5.100*	0.816	0.000	-6.41	-3.79
	Ciprofloxacino	-25.400*	0.816	0.000	-26.71	-24.09
Ciprofloxacino	100%	15.000*	0.816	0.000	13.69	16.31
	75%	19.500*	0.816	0.000	18.19	20.81
	50%	20.300*	0.816	0.000	18.99	21.61
	25%	25.400*	0.816	0.000	24.09	26.71
*. La diferencia de medias es significativa en el nivel 0.5.						

ANEXO 06
CONSTANCIA DE EJECUCIÓN DE PROYECTO



San José
LABORATORIO CLÍNICO
Calidad y profesionalismo al servicio de tu salud

CONSTANCIA DE EJECUCIÓN DE PROYECTO

El Laboratorio "San José" deja constancia que ha prestado sus instalaciones, en donde la Srta. CARLA CATERINA AVALOS FLORES estudiante de Medicina de la Universidad César Vallejo de Trujillo, ejecutó la parte experimental de su proyecto de tesis titulado "Efecto antibacteriano del extracto etanólico de la flor de *Hibiscus rosa-sinensis* linn "rosa de china" sobre cepas de *Escherichia coli* ATCC 25922 comparado con ciprofloxacino, estudio in vitro", durante los días 12 al 18 de setiembre de 2018, bajo la orientación y asesoramiento del Microbiólogo Jaime Abelardo Polo Gamboa.

Se expide la presente a solicitud de la estudiante, sólo para fines académicos, a los 20 días del mes de setiembre de 2018.



José Luis Callio Guerrero
BIÓLOGO - MICROBIÓLOGO
C.B.P. 0201

Sede Principal: Francisco Bolognesi 678 Of. 203 - Centro Histórico - Trujillo
Sucursales: Los Corales 277- Barrio Médico Urb. Santa Inés - Trujillo
☎ 769999 - ☎ 948649844
✉ sanjoselabs@hotmail.com @ www.sanjoselabs.amawebs.com/